

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)



Detección y cuantificación de bacterias asociadas a enfermedades periodontales en bacteriemias relacionadas con el tratamiento periodontal básico en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida. Ensayo clínico aleatorizado.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

Autor:

**Raquel Seco García**

Tutor:

Dra. Margarita Iniesta Albentosa

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

## TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

### VISTO BUENO DEL TUTOR

#### MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

#### El profesor/a tutor

Nombre y apellidos:

MARGARITA INIESTA ALBERTOSA

#### del alumno/a

Nombre y apellidos

RAQUEL SELO GARCÍA

#### encuadrado en la línea de investigación

EFICACIA DE INTERVENCIONES PARA EL TRATAMIENTO DE  
GINGIVITIS, PERIODONTITIS Y ENFERMEDADES PERI-IMPLANTARIAS

#### DA EL VISTO BUENO

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

Detección y caracterización de bacterias asociadas a enfermedad periodontal en  
bacteriemia relacionadas con el tratamiento periodontal básico en pacientes con  
enfermedad cardiovascular establecido. Ensayo clínico aleatorizado.

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En MADRID, a 4 de SEPTIEMBRE de 2017.

Fdo: el profesor/a

El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y tres copias en papel

**MÁSTER EN: CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**COMPROMISO DEONTOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN, REDACCIÓN  
Y POSIBLE PUBLICACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER (TFM)**

**CENTRO:** FACULTAD DE ODONTOLÓGICA

**ESTUDIANTE DE MÁSTER:** RAQUEL YELO GARCIA

**TUTOR/ES DEL TFM:** MARGARITA INIESTA ALBERTO

**TÍTULO DEL TFM:**

"Detección y cuantificación de bacterias asociadas a enfermedad periodontal en bacteriemia relacionados con el tratamiento periodontal básico en pacientes con enfermedad cardiovascular establecido. Ensayo clínico aleatorizado"

**FECHA DE PRIMERA MATRÍCULA:** SEPTIEMBRE -2016

**FECHA DE SEGUNDA MATRÍCULA** (en caso de producirse):

**1. Objeto**

El presente documento constituye un compromiso entre el estudiante matriculado en el Máster en

CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
y su Tutor/es y en el que se fijan las funciones de supervisión del citado trabajo de fin de máster (TFM), los derechos y obligaciones del estudiante y de su/s profesor/es tutor/es del TFM y en donde se especifican el procedimiento de resolución de potenciales conflictos, así como los aspectos relativos a los derechos de propiedad intelectual o industrial que se puedan generar durante el desarrollo de su TFM.

**2. Colaboración mutua**

El/los tutor/es del TFM y el autor del mismo, en el ámbito de las funciones que a cada uno corresponden, se comprometen a establecer unas condiciones de colaboración que permitan la realización de este trabajo y, finalmente, su defensa de acuerdo con los procedimientos y los plazos que estén establecidos al respecto en la normativa vigente.

### **3. Normativa**

Los firmantes del presente compromiso declaran conocer la normativa vigente reguladora para la realización y defensa de los TFM y aceptan las disposiciones contenidas en la misma.

### **4. Obligaciones del estudiante de Máster**

- Elaborar, consensuado con el/los Tutor/es del TFM un cronograma detallado de trabajo que abarque el tiempo total de realización del mismo hasta su lectura.
- Informar regularmente al Tutor/es del TFM de la evolución de su trabajo, los problemas que se le planteen durante su desarrollo y los resultados obtenidos.
- Seguir las indicaciones que, sobre la realización y seguimiento de las actividades formativas y la labor de investigación, le hagan su tutor/es del TFM.
- Velar por el correcto uso de las instalaciones y materiales que se le faciliten por parte de la Universidad Complutense con el objeto de llevar a cabo su actividad de trabajo, estudio e investigación.

### **5. Obligaciones del tutor/es del TFM**

- Supervisar las actividades formativas que desarrolle el estudiante; así como desempeñar todas las funciones que le sean propias, desde el momento de la aceptación de la tutorización hasta su defensa pública.
- Facilitar al estudiante la orientación y el asesoramiento que necesite.

### **6. Buenas prácticas**

El estudiante y el tutor/es del TFM se comprometen a seguir, en todo momento, prácticas de trabajo seguras, conforme a la legislación actual, incluida la adopción de medidas necesarias en materia de salud, seguridad y prevención de riesgos laborales.

También se comprometen a evitar la copia total o parcial no autorizada de una obra ajena presentándola como propia tanto en el TFM como en las obras o los documentos literarios, científicos o artísticos que se generen como resultado del mismo. Para tal, el estudiante firmará la Declaración de No Plagio del ANEXO I, que será incluido como primera página de su TFM.

### **7. Procedimiento de resolución de conflictos académicos**

En el caso de producirse algún conflicto derivado del incumplimiento de alguno de los extremos a los que se extiende el presente compromiso a lo largo del desarrollo de su TFM, incluyéndose la posibilidad de modificación del nombramiento del

tutor/es, la coordinación del máster buscará una solución consensuada que pueda ser aceptada por las partes en conflicto. En ningún caso el estudiante podrá cambiar de Tutor directamente sin informar a su antiguo Tutor y sin solicitarlo oficialmente a la Coordinación del Máster.

En el caso de que el conflicto persista se gestionará según lo previsto en el SGIC de la memoria verificada.

## **8. Confidencialidad**

El estudiante que desarrolla un TFM dentro de un Grupo de Investigación de la Universidad Complutense, o en una investigación propia del Tutor, que tenga ya una trayectoria demostrada, o utilizando datos de una empresa/organismo o entidad ajenos a la Universidad Complutense de Madrid, se compromete a mantener en secreto todos los datos e informaciones de carácter confidencial que el Tutor/es del TFM o de cualquier otro miembro del equipo investigador en que esté integrado le proporcionen así como a emplear la información obtenida, exclusivamente, en la realización de su TFM.

Asimismo, el estudiante no revelará ni transferirá a terceros, ni siquiera en los casos de cambio en la tutela del TFM, información del trabajo, ni materiales producto de la investigación, propia o del grupo, en que haya participado sin haber obtenido, de forma expresa y por escrito, la autorización correspondiente del anterior Tutor del TFM.

## **9. Propiedad intelectual e industrial**

Cuando la aportación pueda ser considerada original o sustancial el estudiante que ha elaborado el TFM será reconocido como cotitular de los derechos de propiedad intelectual o industrial que le pudieran corresponder de acuerdo con la legislación vigente.

## **10. Periodo de Vigencia**



Este compromiso entrará en vigor en el momento de su firma y finalizará por alguno de los siguientes supuestos:

- Cuando el estudiante haya defendido su TFM.
- Cuando el estudiante sea dado de baja en el Máster en el que fue admitido.
- Cuando el estudiante haya presentado renuncia escrita a continuar su TFM.
- En caso de incumplimiento de alguna de las cláusulas previstas en el presente documento o en la normativa reguladora de los Estudios de Posgrado de la Universidad Complutense.

La superación académica por parte del estudiante no supone la pérdida de los derechos y obligaciones intelectuales que marque la Ley de Propiedad Intelectual para ambas partes, por lo que mantendrá los derechos de propiedad intelectual sobre

su trabajo, pero seguirá obligado por el compromiso de confidencialidad respecto a los proyectos e información inédita del tutor.

Firmado en Madrid, a 4 de SEPTIEMBRE de 20 17

El estudiante de Máster  RAQUEL RECO GARCIA  Fdo.: 	El Tutor/es  MARGARITA INIESTA  Fdo.: 
---	---

**SR. COORDINADOR DEL MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

### ANEXO I: DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

D./Dña. RAQUEL SECO GARCIA

con NIF 72181324 X, estudiante de Máster en la Facultad de  
ODONTOLOGIA de la Universidad Complutense de Madrid en el

curso 2016 -2017, como autor/a del trabajo de fin de máster titulado  
"detección y cuantificación de bacterias asociadas a enfermedades  
periodontales en bacteriemia relacionada con el tratamiento  
periodontal básico en pacientes con enfermedad cardiovascular estroblecida.  
Ensayo clínico aleatorizado."

y presentado para la obtención del título correspondiente, cuyo/s tutor/ es/son:

MARGARITA INESTA ALBENTOSA

#### DECLARO QUE:

El trabajo de fin de máster que presento está elaborado por mí y es original. No copio, ni utilizo ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones de cualquier obra, artículo, memoria, o documento (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Así mismo declaro que los datos son veraces y que no he hecho uso de información no autorizada de cualquier fuente escrita de otra persona o de cualquier otra fuente.

De igual manera, soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden.

En Madrid, a 4 de SEPTIEMBRE de 2017

Fdo.:



Esta DECLARACIÓN debe ser insertada en primera página de todos los trabajos fin de máster conducentes a la obtención del Título.

# ÍNDICE

---

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Enfermedades periodontales .....	1
1.2.	Medicina periodontal .....	4
1.3.	Endocarditis infecciosa .....	6
1.4.	El tratamiento odontológico y bacteriemias .....	7
2.	HIPÓTESIS .....	9
3.	OBJETIVOS .....	9
4.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	10
4.1.	Selección de la muestra .....	10
4.2.	Cálculo del tamaño muestral .....	11
4.3.	Aleatorización y enmascaramiento .....	11
4.4.	Recogida de datos .....	11
4.5.	Visitas de estudio e intervención .....	13
4.6.	Análisis microbiológico .....	15
4.7.	Análisis estadístico de los datos .....	16
5.	RESULTADOS .....	17
5.1.	Población de estudio .....	17
5.2.	Características de las localizaciones .....	18
5.3.	Resultados microbiológicos .....	19
5.4.	Resultados de las muestras de sangre .....	25
6.	DISCUSIÓN .....	26
7.	CONCLUSIONES .....	32
8.	BIBLIOGRAFÍA .....	33



# I. INTRODUCCIÓN

---

## I.1 ENFERMEDADES PERIODONTALES.

Las enfermedades periodontales son un conjunto de enfermedades de origen multifactorial y de naturaleza infecciosa e inflamatoria, producidas por la interacción de un agente microbiano, un huésped susceptible y una serie de factores ambientales. Según el Workshop internacional de 1999, las enfermedades periodontales se clasifican en diferentes grupos, entre los que se encuentran las enfermedades gingivales y periodontales. La periodontitis, a diferencia de la gingivitis, es una enfermedad cuya expresión provoca una destrucción del hueso alveolar y del ligamento periodontal, cuyo avance puede llegar a provocar la pérdida dentaria.

Según la encuesta publicada en España en 2016 (Carasol et al., 2016), cerca del 40% de la población adulta presenta algún signo clínico de periodontitis. Por su alta prevalencia en la población, es una enfermedad importante en términos de salud pública, teniendo en cuenta que la respuesta al tratamiento es muy favorable y repercute en la salud.

De todos los factores que intervienen en el desarrollo de periodontitis, el factor iniciador (necesario pero no suficiente) será el acúmulo de biofilm supragingival y subgingival, en el que tienen un papel importante las bacterias. Gracias al desarrollo de técnicas moleculares, como la PCR en tiempo real para la detección de la fracción 16s del ARN, se han encontrado más de 700 especies bacterianas presentes en la cavidad oral, muchas de ellas que no habían sido identificadas mediante técnicas convencionales de cultivo (Kinane, 2001, Dentino et al., 2013).

Entre todas estas especies bacterianas se han detectado aquellas que pueden jugar un papel importante en el inicio y la progresión de la periodontitis, al ser capaces de colonizar y sobrevivir para provocar daño en el huésped. Estas bacterias se encuentran generalmente asociadas en grupos o *clusters* bacterianos (Socransky et al., 1998). En estados de salud, estas bacterias ya se encuentran presentes en boca, pero no provocan daños, puesto que están en equilibrio con el huésped.

Ante un daño en el huésped, se altera este equilibrio y el ambiente se vuelve favorable para las bacterias patógenas, lo que da lugar a daños en los tejidos periodontales. Por ello, se considera la periodontitis una infección oportunista polimicrobiana. Son las bacterias pertenecientes a los grupos rojo (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*) y naranja (especies de *Campylobacter*, *Eubacterium nodatum*, especies de *Fusobacterium*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia/nigrescens* y *Streptococcus constellatus*), las que juegan un papel más relevante en la patología periodontal, así como las más prevalentes en el biofilm subgingival.

Otra clasificación de estas bacterias, es según la fuerza de asociación con la periodontitis, desarrollada en el *World Workshop* de Periodoncia de 1996 (Zambon, 1996). Así nos encontramos como las bacterias con mayor fuerza de asociación y por lo tanto un mayor papel en la etiología y progresión de periodontitis son *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia*. Estudios recientes han observado que la prevalencia de pacientes con periodontitis y presencia de *P. gingivalis* es muy elevada en España (superior al 60%) (Sanz et al., 2000). Sin embargo, *A. actinomycetemcomitans* a pesar de no ser tan prevalente, es una bacteria considerada en este grupo, por sus factores de virulencia (Claesson et al., 2011, Haubek et al., 2008).

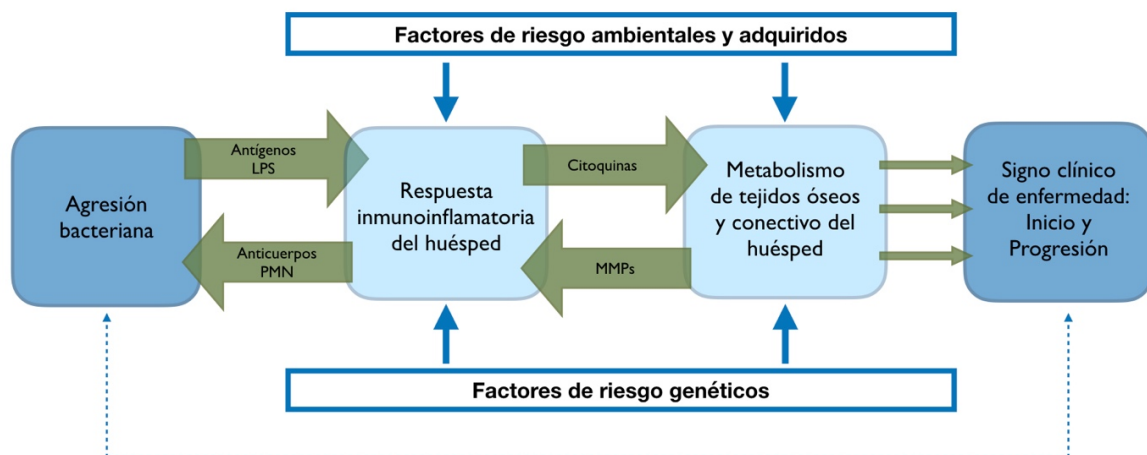
En el segundo grupo, se encuentran *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P.s micra*, *Streptococcus intermedius*, *T. denticola* y espiroquetas asociadas con la gingivitis necrosante. Por último, en el tercer grupo de asociación nos encontraríamos con bacterias como *Eikenella corrodens*, bacilos entéricos, especies de *Selenomonas*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Staphylococcus* y algunos hongos asociados con la periimplantitis, teniendo todos ellos una evidencia como papel iniciador en la etiología de estas enfermedades.

Como ya se ha mencionado al comienzo, la acumulación bacteriana y organización en forma de biofilm, es el iniciador de la periodontitis, pero será la respuesta inmunitaria desencadenada en el huésped la responsable de la destrucción periodontal (Kornman, 2008). Se provoca una respuesta a nivel del surco gingival, en la que los mecanismos de defensa inmunoinflamatorios, son activados por los productos bacterianos, como son los

lipopolisacáridos (LPS), lo que provoca la expresión de anticuerpos y la activación de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) para controlar el ataque bacteriano.

Además, se activan citoquinas [Interleuquina (IL) 1, 6, 8 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )], prostaglandinas y metaloproteinasas (MMPs), promoviendo la destrucción de tejido blando y duro. En la **[Figura 1]** se resume el esquema general de este proceso y los factores de riesgo que promueven las respuestas, es decir, factores ambientales y adquiridos y los factores genéticos.

Los últimos avances en el estudio de la patogenia de la periodontitis han demostrado que además de los complejos microbianos, intervienen factores de riesgo genéticos y adquiridos. (Bouchard et al., 2010, Page et al., 1997, Kornman et al., 1997, Kornman, 2008, Sanz et al., 2010).



**[Figura 1].** Modelo de patogenia multifactorial de las enfermedades periodontales (Adaptado de Kornman et al. (Kornman, 2008)).

## **1.2 MEDICINA PERIODONTAL**

El término “Medicina Periodontal” fue introducido por Steven Offenbacher en 1996. Es la ciencia que estudia la relación entre las enfermedades periodontales y enfermedades sistémicas, así como evalúa su plausibilidad biológica y sus implicaciones preventivas y terapéuticas (Offenbacher, 1996). A partir de ese momento se han realizado numerosos estudios analizando esta posible unión. La periodontitis ha sido relacionada con enfermedades o estados sistémicos como la diabetes, el embarazo o ciertas enfermedades cardiovasculares, entre otras.

En concreto, las enfermedades cardiovasculares han sido activamente estudiadas los últimos años. Un importante número de estudios epidemiológicos han encontrado una posible asociación positiva entre ambas enfermedades (Sanz et al., 2000, Beck et al., 2000, Bouchard et al., 2010, Friedewald et al., 2009). Esta asociación ha provocado un gran interés por la alta prevalencia de las enfermedades periodontales en la población y la cardiopatía isquémica la primera causa de mortalidad en los países desarrollados.

El último consenso de la Federación Europea de Periodoncia sobre periodontitis y enfermedad cardiovascular aterosclerótica (Bouchard et al., 2010) concluyó que los sujetos con periodontitis presentan un riesgo significativamente mayor de padecer enfermedad cardiovascular aterosclerótica, con una *Odds ratio* de 2-3 dependiendo de la población, en base a la evidencia científica disponible. Este riesgo es especialmente mayor para patología cerebrovascular, y se encuentra aumentado en varones e individuos jóvenes. Además, se estableció que este riesgo añadido es independiente de otros factores de riesgo establecidos para enfermedad cardiovascular (Tonetti et al., 2013).

En cuanto a la plausibilidad biológica de esta unión existen 2 vías de asociación, directa e indirecta (Beck et al., 2000, Persson and Persson, 2008, Sanz et al., 2000, Sanz et al., 2010). En la vía directa, serán las bacterias presentes en el biofilm dental las que pasen al torrente sanguíneo produciendo bacteriemias. Estas bacterias, principalmente *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *E. corrodens*, llegan al torrente sanguíneo y colonizan las placas de ateroma dando lugar a procesos inflamatorios aterogénicos.

Varios estudios demuestran la presencia de estas bacterias orales (implicadas en la periodontitis) en las placas de ateroma y aneurismas de la aorta. Además, estudios prospectivos también encuentran que patógenos periodontales como *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* están asociados con riesgos futuros de accidente cerebrovascular, infarto agudo de miocardio y síndrome coronario agudo (Pussinen et al., 2007, Persson and Persson, 2008, Renvert et al., 2006, Mattila et al., 2005).

Si la relación entre ambas enfermedades se produce por vía indirecta, las bacterias presentes en el biofilm subgingival van a provocar una respuesta inmunitaria en el huésped, dando lugar a una inflamación local. Esta provoca un aumento en de los factores inflamatorios séricos, provocando un denso infiltrado inflamatorio, macrófagos y células linfoides. Como consecuencia, se produce una respuesta inmuno-inflamatoria, con la liberación de citoquinas (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), prostaglandina E2 y diferentes metaloproteinasas. Estas podrían diseminarse sistémicamente y provocar una respuesta sistémica que puede influir en el inicio y maduración de las placas de ateroma. Sobre todo como consecuencia de una exposición repetida a estas bacterias, lo que provoca un estado constante de inflamación en los tejidos (Reyes et al., 2013).

Finalmente, para probar esta relación se realizan estudios de intervención en los que se establezca una relación causal entre periodontitis y enfermedades cardiovasculares. Un estudio relevante por su diseño e importancia es el ensayo clínico publicado por Tonetti et al. (Tonetti et al., 2007). En este estudio observan una mejora significativa de los parámetros periodontales. También observaron que mejoraba tras el tratamiento intensivo periodontal de manera transitoria en la respuesta inflamatoria sistémica aguda y disfunción endotelial; y a los 6 meses mejora de la función endotelial. Sin embargo, no tienen en cuenta el riesgo cardiovascular previo de los pacientes incluidos.

### **I.3 ENDOCARDITIS INFECCIOSA.**

La endocarditis infecciosa es una enfermedad provocada por la inflamación del revestimiento interno de las válvulas y cavidades cardíacas (endocardio), provocada por la infección de un microorganismo, por lo general bacterias, aunque en algunas ocasiones se han detectado hongos de la especie *Cándida*. La infección genera unas estructuras muy características denominadas vegetaciones.

En la práctica clínica general es uno de los problemas clínicos más difíciles de controlar, aunque en la odontología, la prevalencia de endocarditis infecciosa es rara. Los ingresos suelen ser complejos y prolongados y la mortalidad intrahospitalaria está alrededor del 20%. Además, un 5-10% de los pacientes tienen nuevos episodios de endocarditis (Delahaye et al., 1995, Delahaye, 2016, Lockhart and Durack, 1999).

En odontología, la incidencia como resultado de tratamiento periodontal no está clara. A pesar de existir una relación entre tratamientos dentales y endocarditis bacteriana, el número de casos encontrados en la literatura oscilan solo entre el 4-7.5% (Gendron et al., 2000). Entre los procedimientos odontológicos, los que más pueden provocar endocarditis bacteriana son las extracciones, raspado y alisado radicular, debido a la posibilidad de que, a través del sangrado que provocan este tipo de intervenciones, se introduzcan bacterias en el torrente sanguíneo, es decir, que tenga lugar una bacteriemia (Crasta et al., 2009, Roberts et al., 2006, Lucas et al., 2008, Tomas et al., 2007).

Dentro de las condiciones cardiovasculares que aumentan el riesgo de padecer endocarditis están, historia previa de endocarditis, prótesis valvulares, estenosis valvular, defecto del ventrículo y daño valvular como consecuencia de fiebres reumáticas. Estas patologías pueden provocar cambios en el endocardio o en el torrente sanguíneo, lo que permite a los organismos adherirse y multiplicarse formando las vegetaciones. Como consecuencia se produce un daño sistémico severo con afectación directa sobre la función del corazón. Además, se pueden desprender y fracturar parte de las vegetaciones, y alojarse en otra parte de la circulación sanguínea provocando embolismo (Glenny et al., 2013).

## **1.4 EL TRATAMIENTO ODONTOLÓGICO Y BACTERIEMAS.**

La bacteriemia se define como una presencia de bacterias en sangre, transitoria, intermitente o continua. Está relacionada con la magnitud del daño en los tejidos, la cantidad de bacterias que alcanzan el torrente sanguíneo y la inflamación o infección en el sitio del daño (Horliana et al., 2014, Carmona et al., 2002).

Las bacterias pueden alcanzar el torrente sanguíneo a través de diferentes vías de entrada, especialmente las superficies mucosas. El periodonto está en constante exposición a las bacterias y por lo tanto a un cierto grado de inflamación, por lo que es un punto potencial de entrada de las bacterias a la sangre (Glenny et al., 2013), sobre todo en aquellos pacientes con periodontitis en los que las bacterias se encuentran en íntimo contacto con el epitelio ulcerado de la bolsa (Horliana et al., 2014). Por este motivo, cualquier alteración física del epitelio subgingival, aproximadamente 10 capas de células de espesor, podría dar lugar al paso de bacterias periodontales al sistema vascular (Reyes et al., 2013, Parahitiyawa et al., 2009).

La frecuencia de bacteriemias tras procedimientos dentales varía entre el 0-100%. Esta variación puede ser debido al empleo de diferentes sistemas de análisis microbiológico, diferentes tratamientos dentales y enfermedades. De todos los procedimientos dentales, son las extracciones las que más provocan bacteriemias. Las bacterias ingresan el torrente sanguíneo inmediatamente después del tratamiento y normalmente cesan tras 30 minutos (Olsen, 2008). En el caso de los tratamientos periodontales (raspado y alisado radicular) oscila entre 13-80%, sondaje periodontal 20-43% y en la cirugía periodontal del 60% (Kinane et al., 2005, Crasta et al., 2009, Daly et al., 2001).

A pesar de su detección, estudios recientes sugieren que la bacteriemia es más fácil que se produzcan durante actos cotidianos, como el cepillado o la masticación, más que por una acción determinada o un tratamiento dental que provoque un sangrado y por lo tanto el riesgo de endocarditis está relacionado por un riesgo acumulado de una exposición diaria de las bacterias a sangre y no tanto una relación exposición-procedimiento (Gould et al., 2006).

*Streptococcus oralis*, es considerado uno de los colonizadores primarios del biofilm subgingival y ha sido uno de más detectados en sangre tras el cepillado y raspado y alisado radicular (Marin et al., 2017). *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* son patógenos periodontales asociados con periodontitis, que han sido también identificados en placas ateroscleróticas, aneurismas de la arteria abdominal y válvulas cardíacas (Figuerro et al., 2011, Iwai, 2009). Además estos patógenos también han sido encontrados en sangre, aunque en una menor frecuencia que *S. oralis* en muestras sanguíneas después del cepillado (Mougeot et al., 2015, Lucas et al., 2008), uso de seda dental (Crasta et al., 2009) o raspado y alisado radicular (Castillo et al., 2011).

Por ello, la periodontitis puede contribuir al aumento del riesgo en el desarrollo de una enfermedad sistémica, especialmente puede tener un efecto dañino sobre las enfermedades cardiovasculares o en el desarrollo de endocarditis infecciosa. Las bacterias periodontopatógenas, como *P. gingivalis*, activan la respuesta plaquetaria y la secreción de citoquinas y serotonina.

Con esta relación entre patógenos periodontales, bacteriemias y enfermedades cardiovasculares, interesa profundizar en la relación entre bacteriemias y el tratamiento periodontal básico en pacientes cardiovasculares, con el fin de averiguar si a parte de esta relación, existe un riesgo añadido en pacientes cardíacos.



## 2. HIPÓTESIS:

---

En pacientes con periodontitis crónica y enfermedad cardiovascular establecida, la realización del tratamiento periodontal básico, consistente en raspado y alisado radicular, aumenta el riesgo de sufrir bacteriemias frente al tratamiento periodontal mediante tartrectomía. Pudiendo ser detectado en sangre mediante técnicas microbiológicas de cultivo.

## 3. OBJETIVOS:

---

### **3.1 OBJETIVO GENERAL.**

Detectar y cuantificar el nivel de bacterias periodontales que ingresan en el torrente sanguíneo durante el tratamiento periodontal básico en pacientes con periodontitis crónica y con enfermedad cardiovascular establecida.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Confirmar que el tratamiento periodontal básico (raspado y alisado radicular con anestesia) mejora los parámetros microbiológicos de los pacientes en comparación con el grupo control.
2. Comparar la presencia y cantidad de bacterias periodontales presentes en sangre según los grupos de intervención (test y control).
3. Comparar el nivel de bacteriemia producido en función de la presencia y cantidad de bacterias periodontales en la bolsa periodontal.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

---

Se diseñó un ensayo clínico aleatorizado controlado, paralelo y doble ciego. Los pacientes se seleccionaron del Servicio de Cardiología del Hospital Severo Ochoa de Leganés que acudían de forma secuencial a la unidad de Rehabilitación Cardíaca por padecer enfermedad cardiovascular establecida.

### 4.1 SELECCIÓN DE LA MUESTRA.

#### 4.1.1. Criterios de inclusión:

- a. Enfermedad cardiovascular establecida: antecedentes de síndrome coronario agudo (angor inestable o infarto) en los 3 a 12 meses previos, con fracción de eyección ventricular izquierda  $\geq 50\%$ .
- b. Diagnóstico de periodontitis crónica moderada/avanzada generalizada: profundidades de sondaje superiores a 5mm y pérdida ósea marginal superior al 30% en al menos el 50% de los dientes (Tonetti et al., 2007)
- c. Presencia de al menos 3 dientes por cuadrante.

#### 4.1.2. Criterios de exclusión:

- d. Pacientes que hayan recibido tratamiento periodontal en el último año.
- e. Toma de antibióticos en los 3 meses previos al estudio.
- f. Fumadores de 10 o más cigarrillos al día.
- g. Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
- h. Diabetes mellitus tipo I o tipo II con valores de hemoglobina glicosilada  $>7$ .
- i. Enfermedades periodontales necrosantes.
- j. Infección por VIH.
- k. Toma crónica de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

Por otro lado, aquellos pacientes que tras varias visitas de seguimiento se observaba una progresión de la enfermedad periodontal (es decir, presentaban pérdidas de inserción mayores de 2mm) fueron retirados del estudio, se les realizó el tratamiento periodontal oportuno y solo fueron considerados sus datos hasta ese momento.

## **4.2 CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL.**

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó basándonos en la variable primaria, cambio en la profundidad de sondaje. Por lo tanto, se estimó que para encontrar una diferencia estadísticamente significativa entre grupos de 1,02 mm, con una desviación estándar de 0.8mm (Oteo et al., 2010) y con un riesgo del 5% y una potencia del 90% se necesitaban 48 pacientes por grupo (Domenech and Granero, 2010). Pero asumiendo una posible pérdida del 20% se seleccionaron 60 sujetos por grupo.

El nivel de significación se estableció en  $p < 0,05$ . Y el software utilizado para el análisis fue IBM® SPSS® Statistics 20.

## **4.3 ALEATORIZACIÓN Y ENMASCARAMIENTO.**

Los sujetos se asignaron aleatoriamente a los grupos de tratamiento en orden ascendente según un sistema de distribución por bloques de 4 pacientes a través de una tabla generada mediante ordenador y realizada por el monitor del ensayo. Por otro lado, la asignación de la intervención fue revelada al operador al inicio del tratamiento periodontal.

En cuanto al enmascaramiento, los examinadores fueron personas diferentes a los operadores, de tal forma que desconocían el tratamiento recibido por los pacientes. Además, también se enmascaró al paciente y al analista, al cual se le aportó la información con los nombres de los grupos ocultos.

## **4.4 RECOGIDA DE DATOS.**

### **4.4.1. Historia médica:**

Se recogieron todos los datos de la historia médica completa de los pacientes antes del comienzo del tratamiento, durante la visita de selección de los pacientes en el Hospital Severo Ochoa de Leganés.

#### 4. 4. 2. Datos periodontales:

Se registraron todas las variables clínicas periodontales mediante una sonda periodontal UNC-15 (Hu-Friedy®, Rotterdam, Holanda) por un único examinador calibrado, en seis localizaciones por diente a excepción de los terceros molares. Las variables registradas fueron: dientes presentes (como presente/ausente), profundidad de sondaje, recesión en milímetros, índice de placa (presente/ausente), sangrado al sondaje (presente/ausente 30 segundos después del sondaje), supuración (presente/ausente 30 segundos después del sondaje), movilidad, lesión de furcación y grado de pérdida ósea (<30%, 30-50%, >50%) mediante una radiografía panorámica.

#### 4. 4. 3. Muestras microbiológicas (subgingivales y de sangre):

##### 4. 4. 3. 1 Toma de muestras subgingivales:

Para la toma de muestras se seleccionó la localización más accesibles y que presentaba una mayor profundidad de sondaje y sangrado al sondaje en cada cuadrante, y se introdujeron 2 puntas por cada una de estas localizaciones (Mombelli et al., 1991). Primero se aislaron las zonas de interés con rollos de algodón y se secaron con aire. A continuación, se introdujeron dos puntas de papel estériles (nº 30; Maillefer®, Ballaigues, Suiza) de forma consecutiva en el surco periodontal y se dejaron en esa posición durante 10 segundos. Después se introdujeron en un único vial con 2 ml de fluido de transporte reducido (RTF) (Sanz et al., 2000) y fueron enviadas al laboratorio de investigación de la Facultad de Odontología de la UCM para su análisis.

##### 4. 4. 3. 2 Toma de muestras de sangre:

Todos los procedimientos fueron realizados en el quirófano de implantes de la Clínica de Postgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología, UCM. Se tomaron muestras de sangre periférica en la vena antecubital del brazo mediante técnica convencional (Vacutainer™, BectonDickinson, San Agustín de Guadalix, Madrid, España) y según las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica (Loza Fernández de Boadilla, 2003)

El volumen de sangre extraído en cada momento fue de 4 ml, de los cuales 2 ml fueron empleados para el análisis mediante cultivo y 2 ml fueron almacenados para su análisis posterior mediante PCR. La extracción de sangre se realizó en 3 momentos: antes de comenzar el tratamiento periodontal, a los 3 y los 10 minutos de inicio del tratamiento. Posteriormente se continuó con el tratamiento periodontal indicado.

Secuencia de toma de muestras para ambos grupos de intervención (test y control):

- Extracción inicial de sangre (4 ml) justo antes de comenzar el tratamiento.
- Se comienza el raspado y alisado radicular por el cuadrante con mayor afectación periodontal, seleccionándose las 10 localizaciones más profundas de dicho cuadrante y se raspan con curetas cada una de estas localizaciones durante 1 minuto.
- Al cabo de 3 minutos, se detiene el tratamiento y se toman de nuevo muestras de sangre (4 ml). Y se reanuda el tratamiento.
- Pasados 10 minutos del comienzo del tratamiento, se vuelve a detener y se toma la tercera muestra de sangre (4 ml), y como en el caso anterior.
- Posteriormente, se continúa con el procedimiento asignado de forma rutinaria.

## **4.5 VISITAS DE ESTUDIO E INTERVENCIÓN.**

Los tratamientos fueron realizados en la clínica del Máster de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), por un operador experimentado.

### **4.5.1. Grupo test:**

El tratamiento periodontal básico fue realizado en dos sesiones de raspado y alisado radicular (RAR) (Curetas Gracey; Hu-Friedy®; Leinmen, Alemania) bajo anestesia local, en un intervalo de 24 horas. Complementariamente se prescribió el empleo de un colutorio de clorhexidina al 0,12% (Perio-Aid®; Dentaïd, España). Posología: 15 ml, 60 segundos, cada 12 horas durante dos semanas y comenzando el primer día de tratamiento.

#### 4. 5. 2. Grupo control:

Se realizó el tratamiento periodontal consistente en dos sesiones de tartrectomía y profilaxis (Piezón® Master 700; EMS, Nyon, Suiza) bajo anestesia, según necesidades del paciente, en un intervalo de 24 horas. Complementariamente se prescribió el empleo de un colutorio a base de flúor (Fluor-Aid®; Dentaïd, España). Posología: 15 ml, 60 segundos, cada 12 horas durante dos semanas y comenzando el primer día de tratamiento.

Finalizado este periodo ambos grupos recibieron tratamiento periodontal de mantenimiento cada 3 meses, cuando la situación inicial estaba estabilizada.

### 4.6 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología (UCM) y cada una de las muestras se analizó mediante cultivo (en las 2 horas siguientes a su toma).

#### 4. 6. 1. Procesado de las muestras subgingivales:

Las puntas de papel se vortearon durante 30 segundos y se prepararon diluciones seriadas 1:10 en PBS (*Phosphate-Buffered Saline*). De cada dilución se sembraron 100 µl en medio agar no selectivo (Oxoid no 2; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), suplementado con sangre de caballo al 5%, hemina (5mg/l) y menadiona (1mg/l) para la determinación del recuento total de anaerobios y para la identificación de los patógenos bacterianos específicos (*P. gingivalis*). Para el recuento de *A. actinomycetemcomitans*, las muestras también se sembraron en placas de medio Dentaïd-1 (Alsina et al., 2001).

Las placas de agar sangre fueron examinadas tras 7 y 14 días de incubación anaeróbica (80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> at 37°C). Las placas Dentaïd-1 necesitaron entre 3 y 5 días de incubación a 37°C en aire con 5% de CO<sub>2</sub>.

Los recuentos totales de anaerobios se realizaron en las placas de agar no selectivo. La presencia y la cantidad de los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *P. micra*, *C. rectus* y *F. nucleatum*, además de cualquier otra especie que creció de manera relevante en este medio.

La identificación de las especies bacterianas seleccionadas se basó en la tinción Gram y en la morfología celular, aerotolerancia, producción de catalasa y se confirmó mediante el empleo de test bioquímicos estándar (RapID™ ANA II System; Remel, Lenexa, KS, EE.UU.). Se recontaron las colonias en la placa con la dilución más adecuada, aquella con entre 30 y 300 colonias, y se calculó el porcentaje que supone cada patógeno respecto a la flora total. Los recuentos totales de *A. actinomycetemcomitans* se realizaron en las placas de Dentaïd-1. La identificación se basó en la típica morfología de su colonia (estructura interna de estrella), su reacción catalasa positiva y al uso de una serie de enzimas específicos (RapID™ NH System, Remel, Lenexa, KS, EE.UU.).

#### 4. 6. 2. Procesado de las muestras de sangre:

Las muestras para cultivo fueron analizadas de forma inmediata tras su recogida y se realizaron los siguientes procedimientos:

- 500 µl de sangre fueron sembradas directamente en placas de agar sangre no selectivas.
- 500 µl de sangre fueron sembradas directamente en placas Dentaïd-1.
- 100 µl de sangre fueron sembradas directamente en placas de agar sangre no selectivo cinco veces, en placas diferentes.
- 100 µl de sangre fueron sembradas directamente en placas Dentaïd-1 cinco veces, en placas diferentes.

Para su análisis mediante cultivo se realizaron los mismos procedimientos que en el análisis de muestras de placa subgingival.

## **4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.**

Para los datos continuos, se usó el test de Shapiro-Wilk y la distribución de los datos para analizar la normalidad de la distribución. Se calculó también la media, la desviación estándar y el intervalo de confianza con un 95% para cada visita, así como los cambios entre la visita a los 6 meses y la inicial. Y para mejorar la normalidad de la distribución de los datos microbiológicos se hizo la transformación logarítmica de los mismos.

Para el análisis de los datos con una distribución paramétrica se utilizó el test t pareado y no pareado. Cuando los datos tenían una distribución no paramétrica, la comparación de las variables cuantitativas se realizó con el test U de Mann Whitney.

También se calcularon las frecuencias de detección de las bacterias seleccionadas. Para los datos categóricos se construyeron tablas de contingencia. El análisis intergrupo, se realizó mediante el test exacto de Fisher, tanto para la frecuencia de bacterias como para el sexo de la muestra. Y para el análisis intragrupo se utilizó el test de McNemar.

El nivel de significación se estableció en  $p < 0,05$ . Y el software utilizado para el análisis fue IBM® SPSS® Statistics 20.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.

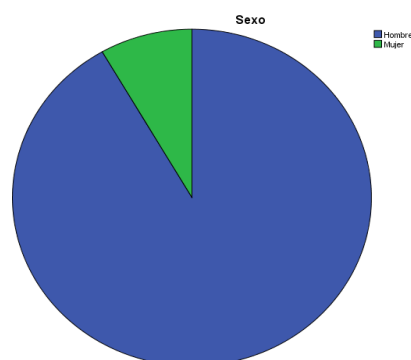
Se reclutaron 20 pacientes para el estudio, pero debido a los abandonos finalmente para este análisis se incluyeron un total de 12 pacientes, con una edad media (desviación estándar) de 57,4 (10,7) años: 5 pacientes en el grupo test y 7 en el grupo control.

En la **[Tabla 1]** se describen las características demográficas de la muestra total al inicio del estudio. No se observan diferencias significativas entre los grupos ( $p>0,05$ ) ni en la edad ( $p= 0,833$ ), ni en el sexo ( $p= 1,000$ ). Sin embargo, cabe destacar que en el total de la muestra ninguno de los pacientes era fumador.

	Grupo CONTROL (n=7)	Grupo TEST (n=5)	TOTAL n=12	Valor <i>p</i>
<b>Edad Media(DE)</b>	56,9 (11,9)	58,3 (10,0)	57,4 (10,7)	0,833
<b>Sexo n (%)</b>				
Hombre	6 (87,7)	5 (100)	11 (91,7)	1,000
Mujer	1 (14,3)	0 (0)	1 (14,3)	
<b>No fumador n (%)</b>	7 (100)	5 (100)	12 (100)	

**[Tabla 1].** Características demográficas de la muestra.

Por otro lado, en la **[Gráfica 1]** se puede observar la distribución en cuanto al sexo, siendo mayor la inclusión de hombres (azul) que de mujeres (rojo) siendo la proporción de 11:1.



**[Gráfica 1].** Distribución de los pacientes en cuanto al sexo.

## 5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS LOCALIZACIONES.

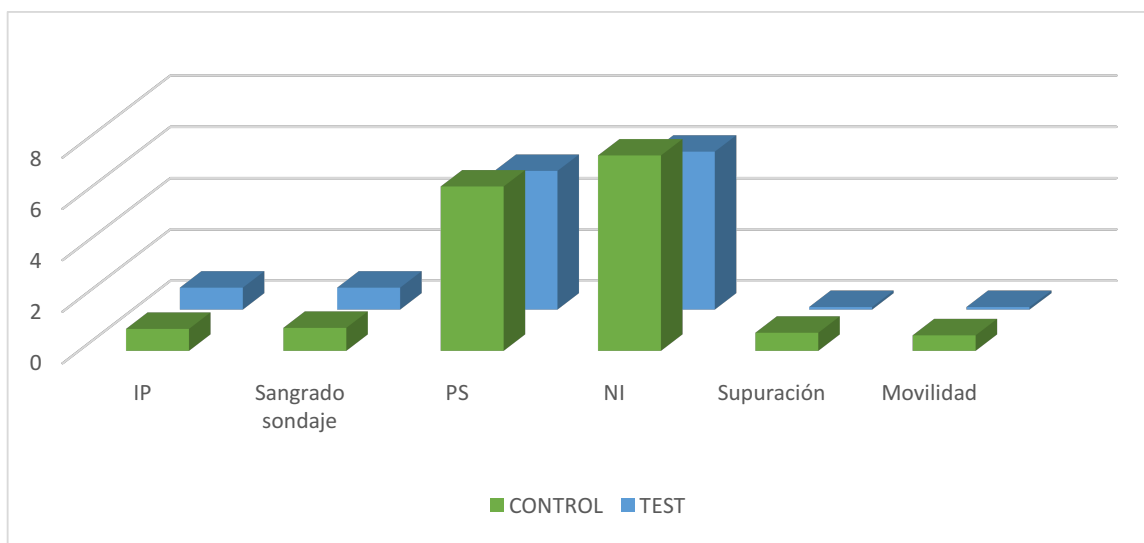
Previamente al tratamiento, se seleccionaron las localizaciones en las cuales se realizaron la toma de muestras. En la **[Tabla 2]** y **[Gráfica 2]** se detallan las características clínicas de las localizaciones utilizadas al inicio del tratamiento.

Para las localizaciones seleccionadas al inicio del tratamiento, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos test y control en ninguno de los parámetros clínicos ( $p>0,05$ ).

Por otro lado, la media (desviación estándar) de la profundidad de sondaje oscila entre los 5-7mm [6,39 (1,00) para el grupo control versus 5,4 (0,51) en el grupo test] y los niveles de inserción entre 6-7mm [7,60 (2,83) en el grupo control versus 6,15 (1,12) en el grupo test].

	Grupo CONTROL			Grupo TEST			Valor $p$
	n	media	DE	n	media	DE	
<b>Índice de Placa (IP)</b>	7	0,85	0,19	5	0,85	0,22	1,000
<b>Sangrado al sondaje</b>	7	0,89	0,13	5	0,85	0,22	0,876
<b>Profundidad de sondaje (PS)</b>	7	6,39	1,00	5	5,4	0,51	0,073
<b>Nivel de inserción (NI)</b>	7	7,60	2,83	5	6,15	1,12	0,268
<b>Supuración</b>	7	0,07	0,18	5	0,10	0,13	0,639
<b>Movilidad</b>	7	0,60	0,77	5	0,10	0,13	0,343

**[Tabla 2].** Parámetros clínicos de las localizaciones seleccionadas, expresados en función de la media y desviación estándar (DE).



[Gráfico 2]. Media de los parámetros clínicos por grupo (Test y Control).

### 5.3 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS.

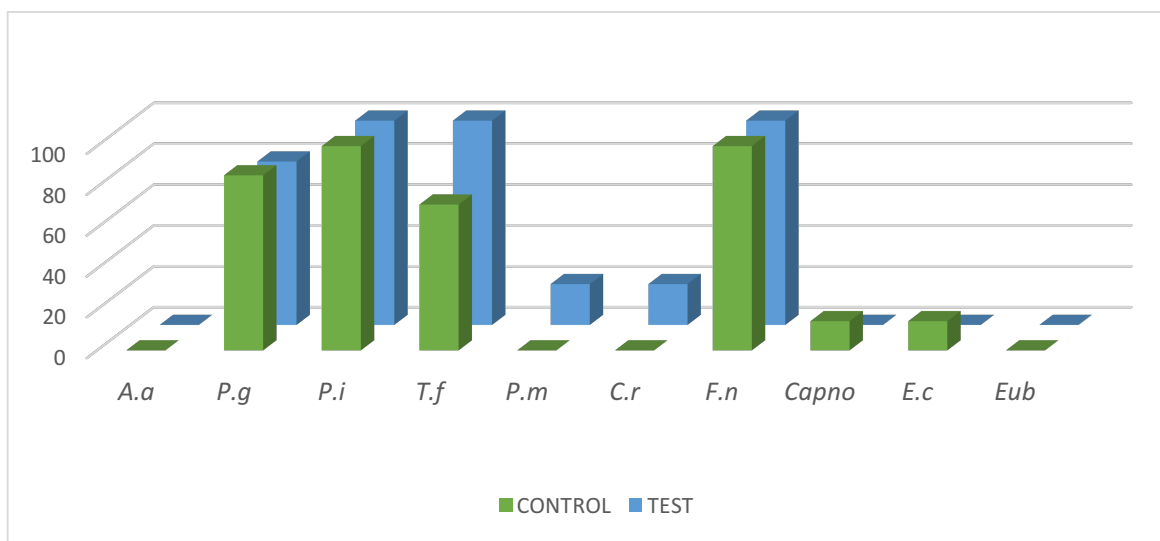
La [Tabla 3] y la [Tabla 4] exponen la frecuencia de detección de las especies bacterianas analizadas. Algunas especies, como *Eubacterium* no fueron detectadas en ninguna de las visitas ni grupos de estudio, mientras que el resto de bacterias se encuentran presentes en algún grupo o visita.

En la [Tabla 3] cabe destacar que *A. actinomycetemcomitans* no fue detectada al inicio del estudio en ninguno de los dos grupos, pero que luego fue detectado en un paciente en el grupo control, a los 6 meses. No obstante, no se observan diferencias significativas en el número de pacientes positivos entre grupos, en ningún momento del estudio ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, en la [Gráfico 3] queda resumida la frecuencia de detección de las bacterias al inicio de tratamiento en ambos grupos de intervención.

En la [Tabla 4] y [Gráfico 4] podemos observar que el número de pacientes positivos para *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, especies de *Capnocytophaga* y *E. corrodens* se redujo a los 6 meses, aunque esta reducción no es estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ). *A. actinomycetemcomitans* y *P. micra* fueron detectadas en más pacientes a los 6 meses que al inicio del estudio, pero sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

	Grupo CONTROL (n=7)	Grupo TEST (n=5)	TOTAL n=12	Valor <i>p</i>
<b><i>A.actinomycetemcomitans</i></b>				
Inicial	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
6 meses	1 (14,3)	0 (0)	1 (8,3)	1,000
<b><i>P.gingivalis</i></b>				
Inicial	6 (85,7)	4 (80)	10 (83,3)	1,000
6 meses	5 (71,4)	3 (60)	8 (66,7)	1,000
<b><i>P.intermedia</i></b>				
Inicial	7 (100)	5 (100)	12 (100)	
6 meses	7 (100)	4 (80)	11 (91,7)	0,417
<b><i>T.forsythia</i></b>				
Inicial	5 (71,4)	5 (100)	10 (83,3)	0,470
6 meses	2 (28,6)	3 (60)	5 (41,7)	0,558
<b><i>P.micra</i></b>				
Inicial	0 (0)	1 (20)	1 (8,3)	0,417
6 meses	1 (14,3)	2 (40)	3 (25)	0,523
<b><i>C.rectus</i></b>				
Inicial	0 (0)	1 (20)	1 (8,3)	0,417
6 meses	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b><i>F.nucleatum</i></b>				
Inicial	7 (100)	5 (100)	12 (100)	
6 meses	5 (71,4)	4 (80)	9 (75)	1,000
<b><i>Capnocytophaga</i></b>				
Inicial	1 (14,3)	0 (0)	1 (8,3)	1,000
6 meses	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b><i>E.corrodens</i></b>				
Inicial	1 (14,3)	0 (0)	1 (8,3)	1,000
6 meses	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b><i>Eubacterium</i></b>				
Inicial	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
6 meses	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

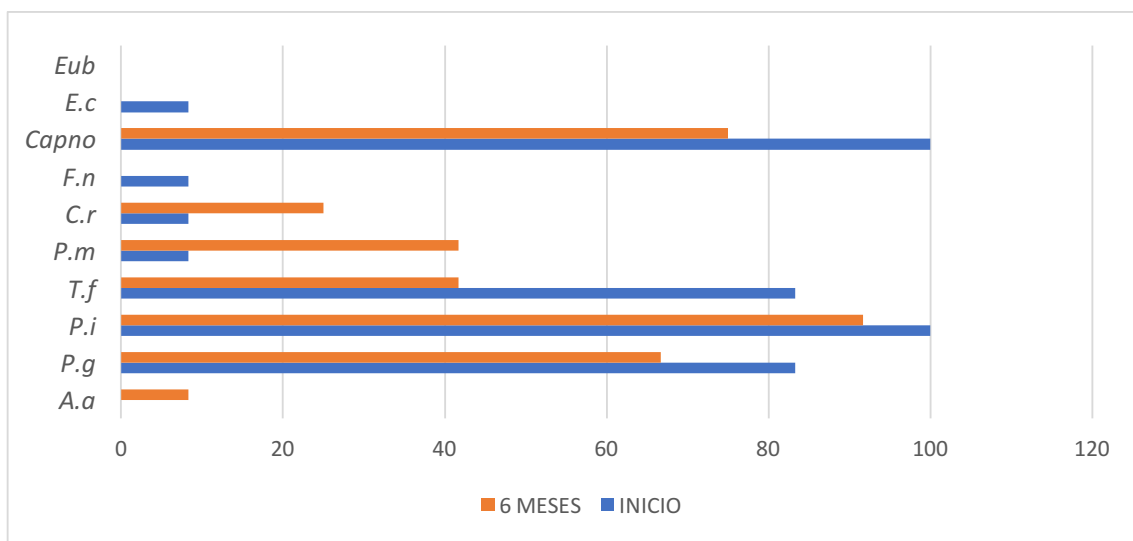
**[Tabla 3].** Número y porcentaje de pacientes positivos para las bacterias seleccionadas. Análisis intergrupo.



**[Gráfico 3].** Frecuencia de detección de las bacterias seleccionadas al inicio del tratamiento. Diferencias intergrupo.

	Inicial (n=12)	6 meses (n=12)	Valor p
<b><i>A.actinomycetemcomitans</i></b>	0 (0)	1 (8,3)	1,000
<b><i>P.gingivalis</i></b>	10 (83,3)	8 (66,7)	0,625
<b><i>P.intermedia</i></b>	12 (100)	11 (91,7)	1,000
<b><i>T.forsythia</i></b>	10 (83,3)	5 (41,7)	0,063
<b><i>P.micra</i></b>	1 (8,3)	3 (25)	0,500
<b><i>C.rectus</i></b>	1 (8,3)	0 (0)	1,000
<b><i>F.nucleatum</i></b>	12 (100)	9 (75)	0,250
<b><i>Capnocytophaga</i></b>	1 (8,3)	0 (0)	1,000
<b><i>E.corrodens</i></b>	1 (8,3)	0 (0)	1,000
<b><i>Eubacterium</i></b>	0 (0)	0 (0)	1,000

**[Tabla 4].** Número y porcentaje de pacientes positivos para las bacterias seleccionadas. Análisis intragrupo.



**[Gráfico 4].** Diferencias intragrupo en la frecuencia de detección de las bacterias seleccionadas.

En la **[Tabla 5]** y **[Tabla 6]** quedan representados el recuento total de la flora y los recuentos individuales de las bacterias seleccionadas, en UFC/ml, al inicio y a los 6 meses, así como el cambio entre ambos momentos (**[Tabla 5]**).

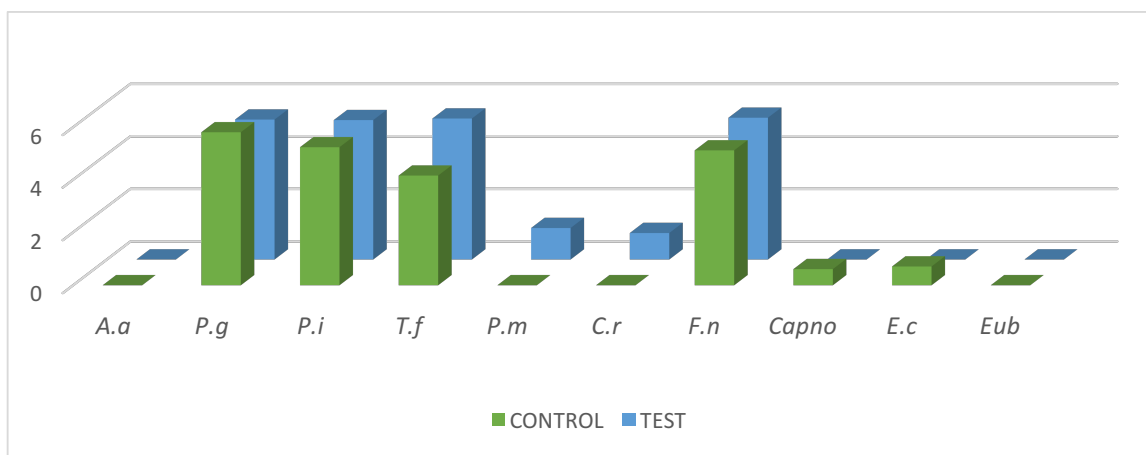
En la **[Tabla 5]** podemos observar que en el grupo control, el recuento total de bacterias al inicio fue de media 7,25 (0,48) frente a los 7,00 (0,69) a los 6 meses del tratamiento, lo que representa un cambio de -0,25 (0,67). En el grupo test, el recuento total al inicio fue de 7,02 (0,38) y de 6,80 (0,28) a los 6 meses, representando un cambio de -0,29 (0,44). A pesar de observarse reducción en el recuento total de bacterias, este cambio no representa diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p = 0,915$ ).

En la mayoría de estas bacterias, se observa una reducción a los 6 meses en el recuento de UFC/ml en ambos grupos a excepción de *A. actinomycetemcomitans*, que aumenta en el grupo control; y *P. micra*, que aumenta en el grupo test y control. A pesar de estas diferencias, en ninguno de los casos se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo test y control ( $p > 0,05$ ).

Además, en la **[Gráfico 5]** quedan resumidos los recuentos individuales de las bacterias seleccionadas para ambos grupos de intervención.

	Grupo CONTROL		Grupo TEST		Diferencia de medias	IC 95%		Valor p
	n	media (DE)	n	media (DE)		Límite superior	Límite inferior	
Recuento total								
Inicial	7	7,25 (0,48)	5	7,02 (0,38)	0,16	-0,42	0,74	0,554
6 meses	7	7,00 (0,69)	5	6,80 (0,28)	0,19	-0,54	0,86	0,565
Cambio	7	-0,25 (0,67)	5	-0,29 (0,44)	0,03	-0,74	0,81	0,915
A.actinomycetemcomitans								
Inicial	7	0 (0)	5	0 (0)				
6 meses	7	0,62 (1,64)	5	0 (0)	0,63	-1,04	2,28	0,424
Cambio		0,62 (1,64)		0 (0)	0,63	-1,04	2,28	0,424
P.gingivalis								
Inicial	7	5,81 (2,65)	5	5,32 (3,01)	0,49	-3,16	4,15	0,769
6 meses	7	4,80 (3,30)	5	3,52 (3,25)	1,28	-3,00	5,56	0,521
Cambio		-1,01 (4,29)		-1,79 (2,43)	0,78	-4,00	5,56	0,723
P.intermedia								
Inicial	7	5,24 (0,96)	5	5,30 (0,60)	-0,50	-1,15	1,03	0,906
6 meses	7	4,97 (1,045)	5	3,56 (2,02)	1,40	-0,56	3,38	0,144
Cambio		-0,27 (1,46)		-1,73 (2,24)	1,46	-0,90	3,83	0,198
T.forsythia								
Inicial	7	4,16 (2,89)	5	5,36 (0,49)	-1,19	-3,88	1,48	0,322
6 meses	7	1,77 (3,032)	5	2,38 (2,75)	-0,60	-4,42	3,20	0,729
Cambio		-2,39 (3,20)		-2,98 (2,93)	0,58	-3,45	4,63	0,752
P.micra								
Inicial	7	0 (0)	5	1,19 (2,66)	-1,19	-4,49	2,11	0,374
6 meses	7	0,75 (2,00)	5	1,89 (2,60)	-1,13	-4,08	1,81	0,410
Cambio		0,75 (2,00)		0,70 (2,14)	0,05	-2,63	2,74	0,966
C.rectus								
Inicial	7	0 (0)	5	1,00 (2,23)	-1,00	-3,77	1,77	0,374
6 meses	7	0 (0)	5	0 (0)				
Cambio		0 (0)		-1,00 (2,23)	1,00	-1,77	3,77	0,374
F.nucleatum								
Inicial	7	5,12 (0,71)	5	5,39 (0,53)	-0,27	1,11	0,57	0,491
6 meses	7	3,45 (2,58)	5	4,19 (2,35)	-0,73	-3,99	2,51	0,624
Cambio		-1,66 (2,55)		-1,19 (2,71)	-0,46	-3,89	2,95	0,767
Capnocytophaga								
Inicial	7	0,61 (1,62)	5	0 (0)	0,61	-1,02	2,25	0,424
6 meses	7	0 (0)	5	0 (0)				
Cambio		-0,61 (1,62)		0 (0)	-0,61	-2,25	1,02	0,424
E.corrodens								
Inicial	7	0,71 (1,88)	5	0 (0)	0,71	-1,19	2,62	0,424
6 meses	7	0 (0)	5	0 (0)				
Cambio		-0,71 (1,88)		0 (0)	-0,71	-2,62	1,19	0,424
Eubacterium								
Inicial	7	0 (0)	5	0 (0)				
6 meses	7	0 (0)	5	0 (0)				
Cambio		0 (0)		0 (0)				

[Tabla 5]. Recuentos totales e independientes de las bacterias seleccionadas, expresados en media de UFC/ml (desviación estándar). Análisis intergrupo.



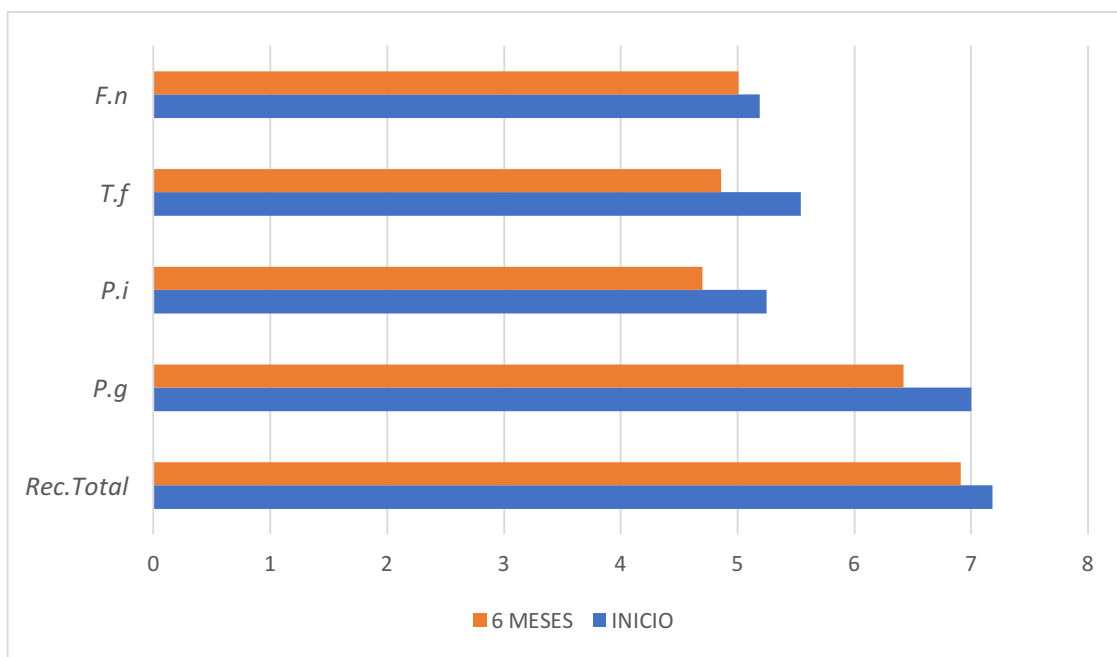
[Gráfico 5]. Recuento individual de bacterias seleccionadas expresado en UFC/ml. Diferencias intergrupo.

Del mismo modo, en la [Tabla 6] y [Gráfico 6] se exponen las diferencias intragrupo. Podemos observar que se produce una reducción en la media de las UFC/ml, desde el inicio a los 6 meses del estudio, en el recuento total de la flora y en *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *F. nucleatum*, las cuales tampoco son significativas ( $p > 0,05$ ). Aunque la reducción de *P. gingivalis* a los 6 meses tiende a la significación ( $p = 0,052$ ).

		n	media (DE)	Diferencia de medias	IC 95%		Valor p
					Límite Inferior	Límite superior	
Recuento total							
Inicial	12	7,18 (4,33)	-0,27	-0,63	0,08	0,126	
6 meses	12	6,91 (0,55)					
P.gingivalis							
Inicial	7	7,00 (0,33)	-0,57	-1,16	0,01	0,052	
6 meses	7	6,42 (0,71)					
P.intermedia							
Inicial	11	5,25 (0,83)	-0,46	-1,32	0,39	0,256	
6 meses	11	4,7 (0,87)					
T.forsythia							
Inicial	5	5,54 (0,71)	-0,68	-3,32	1,94	0,508	
6 meses	5	4,86 (2,09)					
F.nucleatum							
Inicial	9	5,19 (0,44)	-0,17	-0,85	0,50	0,567	
6 meses	9	5,01 (0,93)					

[Tabla 6]. Recuentos totales e independientes de las bacterias seleccionadas, expresados en media de UFC/ml (desviación estándar). Análisis intragrupo.





**[Gráfico 6].** Cambios en el recuento de las bacterias seleccionadas. Diferencias intragrupo.

## 5.4 RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE SANGRE.

Del total de los 12 pacientes analizados, no se observó, en el análisis mediante cultivo, bacteriemias basales, ni a los 3, 6 y 10 minutos del comienzo del tratamiento, en ninguno de los dos medios empleados (Agar sangre y Dentaïd).

## 6. DISCUSIÓN

---

El objetivo principal del estudio fue detectar y cuantificar el nivel de bacterias periodontales que ingresan en el torrente sanguíneo durante el tratamiento periodontal básico en pacientes con periodontitis crónica y enfermedad cardiovascular establecida. Para lo que se realizaron recuentos de bacterias seleccionadas, en muestras tomadas en sangre previo al tratamiento y a los 6 meses. Además, se realizaron los recuentos totales e independientes de las bacterias seleccionadas de muestras obtenidas del surco gingival y se compararon los resultados iniciales y finales con el fin de establecer relaciones en las variaciones con el efecto del tratamiento periodontal básico.

Respecto a la frecuencia de detección de cada bacteria en los pacientes, se vio que *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *F. nucleatum* fueron las bacterias periodontales mayormente detectadas en ambos grupos al inicio del tratamiento y que estas también lo fueron al cabo de 6 meses, aunque su frecuencia de detección disminuyó en todos los grupos. Sin embargo, el número de pacientes positivos para *P. micra*, a diferencia de las anteriores, aumentó a los 6 meses del tratamiento, en ambos grupos.

Los resultados del análisis mediante cultivo de la flora subgingival revelaron que, en recuentos totales de bacterias anaerobias, a nivel oral no existían diferencias estadísticamente significativas entre el grupo al que se realizó RAR y el grupo tratado mediante profilaxis supragingival, ni en la visita basal ni a los 6 meses.

En el recuento individual de cada bacteria tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las bacterias seleccionadas. En ambos grupos, las bacterias más representativas de las muestras fueron *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *F. nucleatum*. Todas ellas redujeron sus recuentos tras la realización del tratamiento y de manera similar en ambos grupos a los 6 meses del tratamiento.

La periodontitis crónica es una de las enfermedades orales más prevalentes en el ser humano, considerándose infecciones donde los patógenos bacterianos presentes en el biofilm subgingival son los responsables del inicio y la progresión de la misma (Genco et al., 1996). Las bacterias anaerobias más importantes relacionadas con las enfermedades periodontales son *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, debido a su fuerte asociación con la periodontitis y a su potencial patogénico. Pero hay un gran número de otras bacterias que se encuentran frecuentemente en estas enfermedades, como *T. forsythia*, y *P. intermedia* (Socransky et al. 1998).

Estudios recientes en España, han confirmado que la bacteria más prevalente en la microflora de los pacientes con periodontitis crónica es *P. gingivalis* (en torno al 20%) (Herrera et al., 2008, Sanz et al., 2000). Sin embargo, cuando se evalúa la frecuencia de pacientes positivos para determinadas bacterias se ha observado que, pese a que *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* tienen una fuerte asociación con la periodontitis, no son las más detectadas. Según Herrera et al. *F. nucleatum* fue detectada en el 100% de los pacientes, seguido de *P. intermedia* (97,2%), *P. gingivalis* (77,5%) y *T. forsythia* (36,7%) (Herrera et al., 2008). En otro estudio, Sanz et al. también se observaron resultados similares, *F. nucleatum* (100%); *P. intermedia* (74,2%); *P. gingivalis* (64,5%) y *T. forsythia* (64,5%) (Sanz et al., 2000). Todos estos resultados se encuentran en consonancia con los obtenidos en el presente estudio, en el que también *F. nucleatum* y *P. intermedia* (100% de los pacientes), seguido de *P. gingivalis* y *T. forsythia* (83% de los pacientes) han sido detectadas en la mayoría de los pacientes.

En cuanto *A. actinomycetemcomitans*, un estudio reciente sobre la caracterización y distribución de *A. actinomycetemcomitans* en España (Minguez et al., 2014) observó que la prevalencia es del 5.7%. A la vista de los resultados obtenidos, podemos decir que la prevalencia sigue siendo baja en los pacientes incluidos en el estudio, puesto que sólo se encontró *A. actinomycetemcomitans* en 1 paciente, a los 6 meses. Sin embargo, a diferencia del estudio de Minguez et al., en el que incluyen pacientes con periodontitis crónica y agresiva, nosotros sólo incluimos pacientes con periodontitis crónica y no con periodontitis agresiva, los cuales se relacionan con una mayor detección de *A. actinomycetemcomitans*.

En cuanto al efecto del tratamiento periodontal básico en el recuento total de la flora, la revisión de Teles et al. (Teles et al., 2006) en la que se compara el efecto microbiológico de los diferentes tratamientos periodontales, se concluye que el tratamiento mediante profilaxis supragingival tiene mayores beneficios en bolsas de hasta 3 mm, mientras que el RAR disminuye los recuentos totales e individuales en bolsas mayores de 3 mm, no solo en el momento posterior del tratamiento sino también pasado un tiempo. Sin embargo, en este estudio no obtenemos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, en ambos casos partimos con un recuento total entorno al 7,10 UFC/ml y se obtiene una disminución al cabo de 6 meses de -0,25 en el grupo control y de -0,29 en el grupo test. Es decir, que ambos tratamientos son capaces de reducir los recuentos totales. Las diferencias frente a nuestro estudio pueden ser debidas al reducido tamaño muestral obtenido hasta el momento (n=12), que no permite establecer relaciones concluyentes, y que además a las bolsas periodontales no se le han realizado ningún análisis según los milímetros de la bolsa sino que hemos considerado al paciente como unidad.

En relación a las muestras de sangre, y objetivo principal del estudio, éstas no revelaron la presencia de bacteriemia en ninguno de los sujetos analizados, para ninguna de las bacterias anaerobias seleccionadas y relacionadas con las enfermedades periodontales. Es importante destacar, que no sólo no se observó bacteriemias durante el tratamiento, sino que también se produjo la ausencia de las mismas al inicio del estudio. Si lo comparamos con otros estudios en los que se estudia la prevalencia de bacteriemias en diferentes tratamientos periodontales, se observan ligeras diferencias.

En nuestro estudio se pretendía medir si existían diferencias en cuanto al tratamiento mediante profilaxis supragingival frente al raspado y alisado radicular. En cuanto a la profilaxis supragingival, Kinane et al. (Kinane et al., 2005) observó que la prevalencia de bacteriemias detectada mediante cultivo era de un 13% y que aumentaba ligeramente si se analizaba mediante PCR el segmento 16S del ARN (23%). Sin embargo, estos resultados no han podido demostrarse con nuestro estudio, puesto que en el grupo control no se observaron bacteriemias.

Por otro lado, estudios previos sobre las bacteriemias en el tratamiento periodontal básico, también discrepan con los resultados obtenidos en este estudio. En una revisión realizada por Olsen et al. (Olsen, 2008) en la que se analizaron estudios sobre diferentes procedimientos dentales, se concluyó que la prevalencia de bacteriemias en el tratamiento periodontal básico puede llegar hasta el 70%. Además, se considera que la prevalencia de bacteriemias es mayor en casos de periodontitis crónica frente a pacientes con gingivitis o periodontalmente sanos (Forner et al., 2006). En 2011, Castillo et al. observaron que la prevalencia de patógenos periodontales en sangre periférica tras el raspado y alisado radicular es del 54,8% de los pacientes, detectándose principalmente patógenos tales como, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (Castillo et al., 2011). Otro estudio (Zhang et al., 2013) también encuentra una frecuencia de bacteriemia de 43,3% pasados 10 minutos del RAR. Todo ello concuerda con los resultados de una revisión sistemática reciente en las que el porcentaje de bacteriemias asciende a un 46% de los pacientes, siendo los microorganismos más frecuentemente detectados *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. micras*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus parasanguis*, y algunas especies de *Actinomyces*, *Streptococcus Enterococcus* y en algún caso más aislado *Candida* (Horliana et al., 2014). A pesar de estos resultados, en nuestro estudio no fuimos capaces de demostrar esta relación.

Además, también se han llevado a cabo estudios en los que se analizan las bacterias que ingresan en el torrente sanguíneo y su posible relación con los accidentes cardiovasculares. Así, se ha detectado (Figueró et al., 2014) la presencia de patógenos periodontales tales como *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en muestras de tejido vascular y muestras de sangre en pacientes con problemas cardiovasculares, sin embargo, la prevalencia es muy baja (2,8%) y no permite establecer relaciones concluyentes. La falta de resultados positivos en nuestro estudio, a diferencia del estudio anterior, puede ser debido al tipo de pacientes incluidos en el estudio, en ambos casos son pacientes cardiovasculares, sin embargo, en nuestro estudio estos pacientes se encuentran actualmente bajo tratamiento médico y esto puede influir en la capacidad de las bacterias de ingresar en el torrente sanguíneo.

Todas estas diferencias respecto a estudios publicados con anterioridad pueden ser debida a diversos factores. Por un lado, al momento de toma de muestras de sangre. En todos los casos, se toma en el momento previo al tratamiento, y tras la finalización del mismo, aunque los minutos varían, desde algunos estudios que sólo lo toman el primer minuto tras el tratamiento (Maestre et al. 2008), otros que sólo lo toma a los 5 minutos (Padilla et al. 2007), y otros que no sólo toman una muestra sino que toman 2-3 posteriores al tratamiento a los 5, 10-15 y 30 minutos (Lafaurie et al. 2007; Forner et al. 2006; Castillo et al. 2011; Zhang et al. 2013). En este punto es donde podemos encontrar mayores diferencias con nuestro estudio. En nuestro caso, la toma de muestra se realizaba a los 3, 6, 10 minutos del comienzo de la intervención y no tras la finalización del mismo, ya que se pretendía valorar si el tratamiento periodontal básico provoca bacteriemias de forma inmediata durante el tratamiento.

Cabe destacar que otros autores (Kinane et al. 2005; Castillo et al. 2011; Zhang et al. 2013) utilizan como complemento el análisis mediante técnicas de biología molecular como la PCR. Kinane et al. y Zhang et al. observaron una diferencia porcentual de un 10% entre la detección de cultivo y PCR (de 13 a 23%). En el caso de Castillo et al., a diferencia de los anteriores, la detección con PCR era menor (19%) que lo detectado mediante cultivo (47.6%). Este mismo autor afirma que los medios enriquecidos usados en cultivo tienen una sensibilidad poco fiable, y que no son capaces de detectar números bajos de bacterias. En cambio, el uso de técnicas moleculares podría mejorar la exactitud de los resultados obtenidos, no sólo en el momento tras el tratamiento, sino también al cabo de un tiempo.

Recientemente, ha sido publicado un artículo en el que se compara la capacidad de detección de varios métodos microbiológicos (métodos basados en cultivo y PCR) de manera *in vitro* (Marin et al., 2017). Los resultados indican que el análisis directo mediante cultivo parece ser el método más adecuado para la detección de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *S. oralis*, y que la técnica de PCR tiene capacidad de detección de las bacterias seleccionadas en sangre; sin embargo, su especificidad y sensibilidad aún están por debajo en comparación con la técnica directa o el BACTEC. A pesar de ello, estos resultados deben tomarse con cautela al tratarse de un estudio *in vitro*.

Todo ello podría justificar que, en nuestro estudio, no se hayan encontrado resultados positivos para las bacterias periodontales seleccionadas mediante el uso de técnicas de cultivo directas y que el uso de técnicas de biología molecular podrían conseguir identificar ciertas bacterias en las muestras, ya que estas podrían encontrarse en cantidades por debajo del umbral de detección del cultivo y/o que las bacterias que son capaces de llegar al torrente sanguíneo estuvieran muertas.

En definitiva, debido a que el presente estudio no ha sido capaz de identificar bacteriemias en las muestras de sangre analizadas y al reducido tamaño muestral analizado, nuestros resultados deban ser interpretados y comparados con los de otros estudios con precaución. Sin embargo, nos puede servir como base para el diseño de futuros estudios en los que se tenga en cuenta utilizar técnicas de biología molecular, para así poder complementar la técnica de cultivo y poder comparar la capacidad de detección de las bacterias periodontales.

## 7. CONCLUSIONES

---

Teniendo en cuenta las limitaciones del presente estudio, podemos concluir lo siguiente:

1. El tratamiento de raspado y alisado radicular mejora los parámetros microbiológicos en los pacientes con periodontitis crónica, sin embargo, las diferencias obtenidas con el grupo control (tartrectomía) no son estadísticamente significativas.
2. No se pueden establecer conclusiones en cuanto a si se producen bacteriemias o no durante el raspado y alisado radicular en los pacientes con enfermedad cardiovascular establecida debido a la falta de resultados positivos con la técnica de cultivo.
3. Tampoco se pueden establecer relaciones entre el nivel de bacteriemia y la presencia y/o cantidad de bacterias periodontales debido a la misma razón.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

- ALSINA, M., OLLE E FAU - FRIAS, J. & FRIAS, J. 2001. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
- BECK, J. D., SLADE, G. & OFFENBACHER, S. 2000. Oral disease, cardiovascular disease and systemic inflammation. *Periodontol 2000*, 23, 110-20.
- BOUCHARD, P., BOUTOUYRIE, P., D'AIUTO, F., DEANFIELD, J., DELIARGYRIS, E., FERNANDEZ-AVILÉS, F., HUGHES, F., MADIANOS, P., RENVERT, S. & SANZ, M. 2010. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease consensus document. *European Heart Journal Supplements*, 12, B13-B22.
- CARASOL, M., LLODRA, J. C., FERNANDEZ-MESEGUER, A., BRAVO, M., GARCIA-MARGALLO, M. T., CALVO-BONACHO, E., SANZ, M. & HERRERA, D. 2016. Periodontal conditions among employed adults in Spain. *J Clin Periodontol*, 43, 548-56.
- CARMONA, I. T., DIZ DIOS, P. & SCULLY, C. 2002. An update on the controversies in bacterial endocarditis of oral origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 93, 660-70.
- CASTILLO, D. M., SANCHEZ-BELTRAN, M. C., CASTELLANOS, J. E., SANZ, I., MAYORGA-FAYAD, I., SANZ, M. & LAFAURIE, G. I. 2011. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *J Clin Periodontol*, 38, 418-27.
- CLAESSON, R., LAGERVALL, M., HOGLUND-ABERG, C., JOHANSSON, A. & HAUBEK, D. 2011. Detection of the highly leucotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in members of a Caucasian family living in Sweden. *J Clin Periodontol*, 38, 115-21.
- CRATA, K., DALY, C. G., MITCHELL, D., CURTIS, B., STEWART, D. & HEITZ-MAYFIELD, L. J. 2009. Bacteraemia due to dental flossing. *J Clin Periodontol*, 36, 323-32.
- DALY, C. G., MITCHELL, D. H., HIGHFIELD, J. E., GROSSBERG, D. E. & STEWART, D. 2001. Bacteremia due to periodontal probing: a clinical and microbiological investigation. *J Periodontol*, 72, 210-4.

- DELAHAYE, F. 2016. Which patients with infective endocarditis require emergency surgery?
- DELAHAYE, F., ECOCHARD R FAU - DE GEVIGNEY, G., DE GEVIGNEY G FAU - BARJHOUX, C., BARJHOUX C FAU - MALQUARTI, V., MALQUARTI V FAU - SARADARIAN, W., SARADARIAN W FAU - DELAYE, J. & DELAYE, J. 1995. The long term prognosis of infective endocarditis.
- DENTINO, A., LEE, S., MAILHOT, J. & HEFTI, A. F. 2013. Principles of periodontology. *Periodontol 2000*, 61, 16-53.
- DOMENECH, J. M. & GRANERO, R. 2010. Macro !NSize for PASW Statistics. Sample size and power: Comparisons and estimations for independent proportions, means, correlations, risks and rates (computer program). v2010.06.30 ed. Bellaterra: Universitat Autònoma de Barcelona.
- FIGUERO, E., LINDAHL, C., MARIN, M. J., RENVERT, S., HERRERA, D., OHLSSON, O., WETTERLING, T. & SANZ, M. 2014. Quantification of periodontal pathogens in vascular, blood, and subgingival samples from patients with peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysms. *J Periodontol*, 85, 1182-93.
- FIGUERO, E., SANCHEZ-BELTRAN, M., CUESTA-FRECHOSO, S., TEJERINA, J. M., DEL CASTRO, J. A., GUTIERREZ, J. M., HERRERA, D. & SANZ, M. 2011. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol*, 82, 1469-77.
- FORNER, L., LARSEN, T., KILIAN, M. & HOLMSTRUP, P. 2006. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*, 33, 401-7.
- FRIEDEWALD, V. E., KORNMAN, K. S., BECK, J. D., GENCO, R., GOLDFINE, A., LIBBY, P., OFFENBACHER, S., RIDKER, P. M., VAN DYKE, T. E. & ROBERTS, W. C. 2009. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, 104, 59-68.
- GENCO, R., KORNMAN, K., WILLIAMS, R., OFFENBACHER, S. & ZAMBON, I. I. 1996. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*, 1, 926-32.

- GENDRON, R., GRENIER D FAU - MAHEU-ROBERT, L. & MAHEU-ROBERT, L. 2000. The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections.
- GLENNY, A.-M., OLIVER, R., ROBERTS, G. J., HOOPER, L. & WORTHINGTON, H. V. 2013. Antibiotics for the prophylaxis of bacterial endocarditis in dentistry. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- GOULD, F. K., ELLIOTT, T. S., FOWERAKER, J., FULFORD, M., PERRY, J. D., ROBERTS, G. J., SANDOE, J. A. & WATKIN, R. W. 2006. Guidelines for the prevention of endocarditis: report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother*, 57, 1035-42.
- HAUBEK, D., ENNIBI, O. K., POULSEN, K., VAETH, M., POULSEN, S. & KILIAN, M. 2008. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet*, 371, 237-42.
- HERRERA, D., CONTRERAS, A., GAMONAL, J., OTEO, A., JARAMILLO, A., SILVA, N., SANZ, M., BOTERO, J. E. & LEON, R. 2008. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol*, 35, 106-13.
- HORLIANA, A. C., CHAMBRONE, L., FOZ, A. M., ARTESE, H. P., RABELO MDE, S., PANNUTI, C. M. & ROMITO, G. A. 2014. Dissemination of periodontal pathogens in the bloodstream after periodontal procedures: a systematic review. *PLoS One*, 9, e98271.
- IWAI, T. 2009. Periodontal bacteremia and various vascular diseases. *J Periodontol Res*, 44, 689-94.
- KINANE, D. F. 2001. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, 25, 8-20.
- KINANE, D. F., RIGGIO, M. P., WALKER, K. F., MACKENZIE, D. & SHEARER, B. 2005. Bacteraemia following periodontal procedures. *J Clin Periodontol*, 32, 708-13.
- KORNMAN, K. S. 2008. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*, 79, 1560-8.

- KORNMAN, K. S., PAGE, R. C. & TONETTI, M. S. 1997. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*, 14, 33-53.
- LOCKHART, P. B. & DURACK, D. T. 1999. Oral microflora as a cause of endocarditis and other distant site infections.
- LOZA FERNÁNDEZ DE BOADILLA, E. P. R., A; RODRIGUEZ, M 2003. Procedimientos de Microbiología Clínica 3: Hemocultivos. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- LUCAS, V. S., GAFAN, G., DEWHURST, S. & ROBERTS, G. J. 2008. Prevalence, intensity and nature of bacteraemia after toothbrushing. *J Dent*, 36, 481-7.
- MARIN, M. J., AMBROSIO, N., VIRTO, L., DIZ, P., ÁLVAREZ, M., HERRERA, D., SANZ, M. & FIGUERO, E. 2017. Detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis* in blood samples with different microbiological identification methods: An in vitro study. *Archives of Oral Biology*, 74, 55-62.
- MATTILA, K. J., PUSSINEN PJ FAU - PAJU, S. & PAJU, S. 2005. Dental infections and cardiovascular diseases: a review.
- MINGUEZ, M., POUSA, X., HERRERA, D., BLASI, A., SANCHEZ, M. C., LEON, R. & SANZ, M. 2014. Characterization and serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from a population of periodontitis patients in Spain. *Arch Oral Biol*, 59, 1359-67.
- MOMBELLI, A., MCNABB H FAU - LANG, N. P. & LANG, N. P. 1991. Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*.
- MOUGEOT, F. K., SAUNDERS, S. E., BRENNAN, M. T. & LOCKHART, P. B. 2015. Associations between bacteremia from oral sources and distant-site infections: tooth brushing versus single tooth extraction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 119, 430-5.
- OFFENBACHER, S. 1996. Periodontal Diseases: Pathogenesis. *Annals of Periodontology*, 1, 821-878.

- OLSEN, I. 2008. Update on bacteraemia related to dental procedures. *Transfus Apher Sci*, 39, 173-8.
- OTEO, A., HERRERA, D., FIGUERO, E., O'CONNOR, A., GONZALEZ, I. & SANZ, M. 2010. Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of Porphyromonas gingivalis-associated periodontitis: a pilot study. *J Clin Periodontol*, 37, 1005-15.
- PAGE, R. C., OFFENBACHER, S., SCHROEDER, H. E., SEYMOUR, G. J. & KORNMAN, K. S. 1997. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*, 14, 216-48.
- PARAHITIYAWA, N. B., JIN, L. J., LEUNG, W. K., YAM, W. C. & SAMARANAYAKE, L. P. 2009. Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. *Clin Microbiol Rev*, 22, 46-64, Table of Contents.
- PERSSON, G. R. & PERSSON, R. E. 2008. Cardiovascular disease and periodontitis: an update on the associations and risk. *J Clin Periodontol*, 35, 362-79.
- PUSSINEN, P. J., ALFTHAN G FAU - JOUSILAHTI, P., JOUSILAHTI P FAU - PAJU, S., PAJU S FAU - TUOMILEHTO, J. & TUOMILEHTO, J. 2007. Systemic exposure to Porphyromonas gingivalis predicts incident stroke.
- RENVERT, S., PETTERSSON T FAU - OHLSSON, O., OHLSSON O FAU - PERSSON, G. R. & PERSSON, G. R. 2006. Bacterial profile and burden of periodontal infection in subjects with a diagnosis of acute coronary syndrome.
- REYES, L., HERRERA, D., KOZAROV, E., ROLDA, S. & PROGULSKE-FOX, A. 2013. Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology. *J Periodontol*, 84, S30-50.
- ROBERTS, G. J., JAFFRAY, E. C., SPRATT, D. A., PETRIE, A., GREVILLE, C., WILSON, M. & LUCAS, V. S. 2006. Duration, prevalence and intensity of bacteraemia after dental extractions in children. *Heart*, 92, 1274-7.

- SANZ, M., APOS, AIUTO, F., DEANFIELD, J. & FERNANDEZ-AVILES, F. 2010. *European workshop in periodontal health and cardiovascular disease - Scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases: A review of the literature.*
- SANZ, M., VAN WINKELHOFF, A. J., HERRERA, D., DELLEMIJN-KIPPUW, N., SIMON, R. & WINKEL, E. 2000. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci*, 108, 383-92.
- SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., CUGINI, M. A., SMITH, C. & KENT, R. L., JR. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25, 134-44.
- TELES, R. P., HAFFAJEE, A. D. & SOCRANSKY, S. S. 2006. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000*, 42, 180-218.
- TOMAS, I., ALVAREZ, M., LIMERES, J., POTEL, C., MEDINA, J. & DIZ, P. 2007. Prevalence, duration and aetiology of bacteraemia following dental extractions. *Oral Dis*, 13, 56-62.
- TONETTI, M. S., D'AIUTO, F., NIBALI, L., DONALD, A., STORRY, C., PARKAR, M., SUVAN, J., HINGORANI, A. D., VALLANCE, P. & DEANFIELD, J. 2007. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med*, 356, 911-20.
- TONETTI, M. S., VAN DYKE, T. E. & WORKING GROUP 1 OF THE JOINT, E. F. P. A. A. P. W. 2013. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, S24-S29.
- ZAMBON, J. J. 1996. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol*, 1, 879-925.
- ZHANG, W., DALY, C. G., MITCHELL, D. & CURTIS, B. 2013. Incidence and magnitude of bacteraemia caused by flossing and by scaling and root planing. *J Clin Periodontol*, 40, 41-52.